

嬰幼兒配方乳品中2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-*N*-新四糖之檢驗方法研究

許瀨尤 吳白玟 張淑涵 高雅敏 曾素香 王德原

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

母乳寡糖(Human Milk Oligosaccharides, HMOs)為母乳中含量次於乳糖及脂肪之第三大成分，其中以2'-岩藻糖基乳糖(2'-Fucosyllactose)及乳糖基-*N*-新四糖(Lacto-*N*-neotetraose)於國內外最常被添加使用。衛生福利部(下稱衛福部)於112年公告修正以特定菌株發酵生產之「2'-岩藻糖基乳糖」，可使用於嬰兒與較大嬰兒配方食品及專供7歲以下兒童之乳粉或類似產品，使用限量為1.2 g/L。本研究建立嬰幼兒配方食品中2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-*N*-新四糖之檢驗方法，前處理使用50%乙醇溶液萃取，經振盪離心後，取上清液作為檢液，並以CarboPac PA20 (6 μ m, 3 mm \times 15 cm)層析管柱及高效離子層析儀(High Performance Ion Chromatograph, HPIC)搭配脈衝式電化學檢出器(Pulsed Electrochemical Detector, PED)，以去離子水及200 mM氫氧化鈉溶液作為移動相，於管柱溫度25°C下以流速0.5 mL/min進行梯度沖提，可於35分鐘內完成分析。於嬰幼兒配方食品空白基質中分別添加0.04及0.08 g/100 g之2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-*N*-新四糖標準品，其同日間平均回收率為92-105%，變異係數為1.7-3.9%，異日間平均回收率為88-99%，變異係數為4.7-7.1%，均符合衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)食品化學檢驗方法之確效規範。以本方法檢測3件含HMO之市售嬰幼兒配方奶粉，檢測結果均與標示相符，並符合法規規定之使用限量。

關鍵詞：2'-岩藻糖基乳糖、乳糖基-*N*-新四糖、母乳寡糖、高效離子層析儀

前言

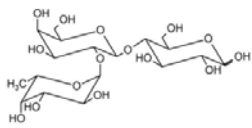
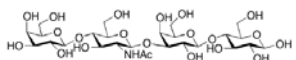
一、母乳寡糖、2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-*N*-新四糖介紹

母乳寡糖(Human Milk Oligosaccharides, HMOs)為母乳中含量次於乳糖及脂肪之第三大成分，係由人體自行合成，會因個體差異使成分些微不同。HMOs於人體中不易被消化，可作為益生質(Prebiotics)，降低新生兒感染病原

菌風險⁽¹⁻³⁾。另有研究顯示少數HMO經消化吸收後可調整免疫白血球功能，幫助免疫系統的平衡調節，減少炎症發生機率⁽⁴⁾。

HMOs主要由葡萄糖(Glucose, Glc)、半乳糖(Galactose, Gal)、*N*-乙醯葡萄糖胺(*N*-Acetylglucosamine, GlcNAc)、岩藻糖(Fucose, Fuc)及唾液酸(Sialic acid, Neu5Ac)等5種單體構成，並以乳糖、乳糖連接*N*-乙醯乳糖胺(*N*-acetylglucosamine)或lacto-*N*-biose之四醣結構作為基礎，經岩藻糖基化(Fucosylation)或

表一、2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖之分子式、分子量及化學結構

英文名	中文名	分子式	分子量	化學結構
2'-Fucosyllactose	2'-岩藻糖基乳糖	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₅	488.44	
Lacto-N-neotetraose	乳糖基-N-新四糖	C ₂₆ H ₄₅ NO ₂₁	707.63	

(Christensen, 2020)

唾液酸化(Sialylation)組成。目前於母乳中已發現超過200種HMOs，但僅有少數可工業化生產，主要生產方式為微生物發酵後再經純化而成，多添加於嬰幼兒奶粉中。

2'-岩藻糖基乳糖為葡萄糖、半乳糖及岩藻糖所構成之三糖，乳糖基-N-新四糖則為葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺及2個半乳糖所構成之四糖(表一)，其中2'-岩藻糖基乳糖是母乳中含量最高的寡糖，約占母乳中總HMOs的30%^(1,5)。

二、2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖之國內外使用規範

依衛福部112年2月7日公告修正「以基因改造大腸桿菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3) #1540菌株發酵生產之食品原料「2'-岩藻糖基乳糖」(2'-Fucosyllactose)之使用限制及標示規定」及「以基因改造大腸桿菌(*Escherichia coli*) K-12 DH1 MDO MAP1001d菌株發酵生產之食品原料「2'-岩藻糖基乳糖」(2'-Fucosyllactose)之使用限制及標示規定」，以該微生物菌株發酵生產之「2'-岩藻糖基乳糖」可作為食品原料使用，且符合上揭規定之加工製程及規格之「2'-岩藻糖基乳糖」，可使用於嬰兒與較大嬰兒配方食品及專供七歲以下兒童之乳粉或類似產品，使用限量以即食或依產品標籤指示調配後的供食狀態作為計算基準，最高為1.2公克/公升^(6,7)。

目前國內尚未開放乳糖基-N-新四糖作為

食品原料使用，然而在歐美及紐澳均已開放2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖添加於奶製品、嬰幼兒配方食品、穀物食品或飲料等食品中。本研究同時開發2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖之檢驗方法，以供各界參考。

材料與方法

一、試驗樣品

嬰幼兒配方食品共3件，其中2件於110年12月購自網路商城，另1件於111年4月購自實體店面，並儲放於室溫備用。確效試驗之空白樣品為不含該成分之某市售嬰幼兒配方奶粉。

二、試藥、溶劑與標準品

乙醇(Ethanol)採用試藥級，購自德國Merck公司(Darmstadt, Germany)。50%氫氧化鈉溶液(Sodium hydroxide solution)採用離子層析級，購自美國Sigma公司(St. Louis, MO, USA)。對照用標準品2'-岩藻糖基乳糖(2'-Fucosyllactose, 純度90%)及乳糖基-N-新四糖(Lacto-N-neotetraose, 純度97%)，皆購自加拿大Toronto Research Chemicals公司(Toronto, Canada)。

三、儀器與設備

- (一)旋渦混合器(Vortex Genie-2, Scientific Industries, USA)
- (二)超音波振盪器(Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH, Germany)
- (三)去離子水製造機(Millipore Milli-Q, Millipore, USA)
- (四)離心機
 - 1. Allegra25R Centrifuge (Beckman Coulter, USA)
 - 2. Centrifuge MPW-251 (MPW MED. Instruments, Poland)
- (五)高效離子層析儀(Dionex™ ICS-5,000+, Thermo Fisher Scientific, USA)

四、試劑之調製

- (一)50%乙醇溶液
取乙醇500 mL，加入去離子水使成1,000 mL。

五、移動相溶液之配製

- (一)移動相溶液A：去離子水
- (二)移動相溶液B (0.2 M氫氧化鈉溶液)：
取50%氫氧化鈉溶液10.5 mL，加去離子水使成1,000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

六、標準溶液之配製

取2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖對照用標準品約5 mg，精確稱定，以50%乙醇溶液溶解並定容至1 mL，作為標準原液，冷藏儲存。臨用時取適量標準原液，以去離子水稀釋至1-10 µg/mL，供作標準溶液。

七、檢液之調製

- (一)檢液調製流程一
將檢體混勻，取約1 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入50%乙醇溶液10

mL，旋渦混勻，超音波振盪10分鐘，再經振盪器振盪10分鐘，以50%乙醇溶液定容至20 mL，於9,000 × g離心30分鐘，取上清液1 mL，以去離子水定容至20 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

(二)檢液調製流程二

將檢體混勻，取約1 g，精確稱定，置於15 mL離心管中，加入去離子水4 mL，旋渦混勻，超音波振盪20分鐘，再經振盪器振盪10分鐘，以去離子水定容至5 mL，將檢液移至5 mL離心管中，於10,000 × g離心30分鐘，取水層至10 kDa離心管中，於7,500 × g離心50分鐘，取水層250 µL，以去離子水定容至20 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

八、高效離子層析儀分析條件

- (一)檢出器：脈衝式電化學檢出器。
 - 1. 金工作電極。
 - 2. 銀/氯化銀參考電極。
- (二)層析管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm × 15 cm。
- (三)保護管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm × 3 cm。
- (四)層析管溫度：25°C。
- (五)樣品注入量：10 µL。
- (六)移動相溶液：依第五節調製之溶液，以表二層析條件進行分析。

表二、高效離子層析儀移動相分析條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0 → 15	90 → 35	10 → 65
15 → 15.1	35 → 0	65 → 100
15.1 → 25	0 → 0	100 → 100
25 → 25.1	0 → 90	100 → 10
25.1 → 35	90 → 90	10 → 10

A：去離子水

B：0.2 M氫氧化鈉溶液

(七)移動相流速：0.5 mL/min。

九、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各10 μ L，分別注入高效離子層析儀中，依第九節條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-新四糖之含量(g/100 g)：

檢體中2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-新四糖之含量(g/100 g)

$$= \frac{C \times V \times F}{M \times 10,000}$$

C：由標準曲線求得檢液中2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-新四糖之濃度(μ g/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數

十、方法確效

依據食藥署公布之「食品化學檢驗方法之確效規範⁽⁸⁾」進行確效試驗，評估本研究檢驗方法之準確度(Accuracy)、精密度(Precision)及定量極限(Limit of Quantification, LOQ)。

(一)標準曲線

標準曲線至少包含5種不同濃度，線性回歸方程式之相關係數不應低於0.99。

(二)準確度及精密度試驗

於同日及異日進行添加回收試驗，將適當濃度之2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-新四糖標準溶液標準溶液添加至空白樣品中，添加濃度分別為0.04及0.08 g/100 g，各濃度皆進行5重複試驗，依前述流程製成檢液，並計算其回收率及變異係數以評估是否符合食品化學確效規範要求。

(三)定量極限之評估

分別將適當濃度之2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-新四糖標準溶液添加至空白樣品中，添加濃度為0.04 g/100 g，依前述流

程操作製成檢液，並計算其回收率、重複性及波峰之訊噪比(Signal/Noise Ratio, S/N)，以回收率、重複性及波峰之訊噪比 ≥ 10 之最低添加濃度作為定量極限。

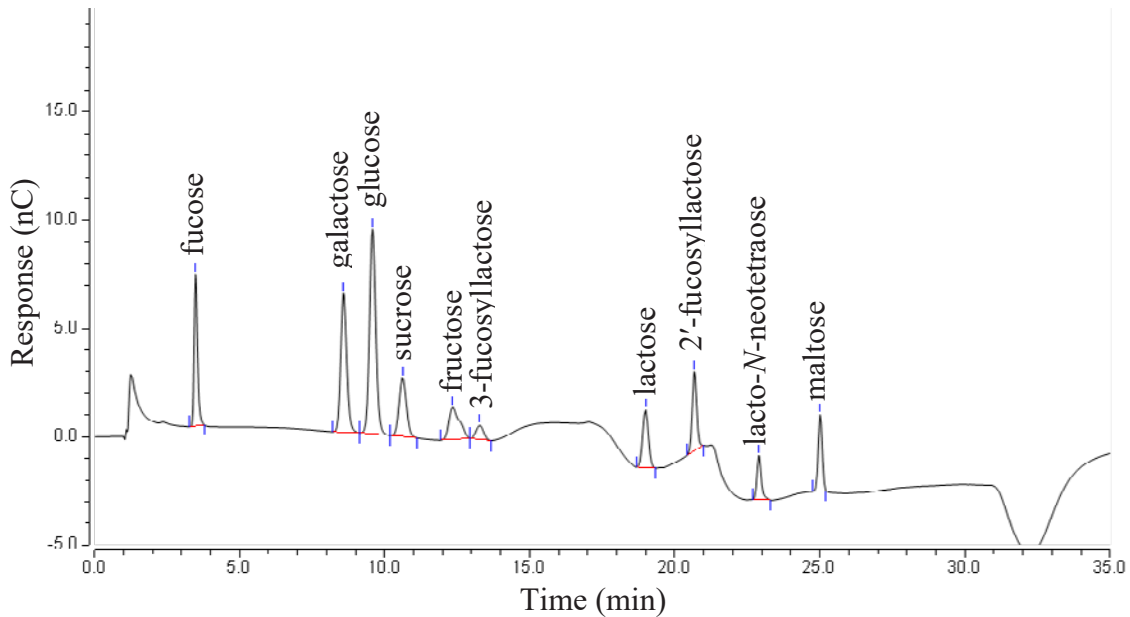
結果與討論

一、層析條件探討

本研究先以「食品中糖類之檢驗方法(TFDAO0022.02)(9)」(下稱建議方法)評估單雙糖與2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖標準品分離情形，該方法是以高效離子層析儀，於管柱溫度30 $^{\circ}$ C進行試驗，結果顯示該層析條件雖可將2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖與其他單雙糖分離，但在低濃度時，於2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖出峰時間基線變化明顯(圖一)，導致定量易有誤差。以S1檢體添加標準品進行試驗，波峰除受其他基質干擾外，亦有基線不穩的情形。

後續分別以去離子水及0.2 M氫氧化鈉溶液以90/10 (A)、75/25 (B)及60/40 (C)之比例進行等梯度沖提，結果如圖二，上述3種層析條件皆可將待測物標準品分離，且基線平穩，惟以等梯度沖提，因出峰時間長，導致波峰較寬，感度較低。後續依材料與方法表二所述層析條件進行梯度沖提，峰型及感度皆較佳，且分析時間較短，惟因奶粉基質複雜，以空白基質添加標準品進行分析時，2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖皆會受基質干擾，為避免前述情況，調整管柱溫度至25 $^{\circ}$ C，即可避免基質干擾，出峰時間分別為11.3及14.7分鐘(圖三)。

綜合上述結果，移動相以梯度沖提方式，於管柱溫度25 $^{\circ}$ C，流速0.5 mL/min，搭配脈衝式電化學檢出器，2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖皆可於15分鐘內出峰。



圖一、1 mg/mL之2'-岩藻糖基乳糖、乳糖基-N-新四糖與岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、3-岩藻糖基乳糖、乳糖及麥芽糖標準溶液之HPIC圖譜

HPIC條件：

層析管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm×15 cm；保護管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm×3 cm；

層析管溫度：30°C；樣品注入量：10 μL；

移動相溶液：去離子水及0.2 M氫氧化鈉溶液以下列條件進行梯度分析；

時間(min)	去離子水(%)	0.2 M氫氧化鈉溶液(%)
0 → 15	90 → 35	10 → 65
15 → 15.1	35 → 0	65 → 100
15.1 → 25	0 → 0	100 → 100
25 → 25.1	0 → 90	100 → 10
25.1 → 35	90 → 90	10 → 10

移動相流速：0.5 mL/min

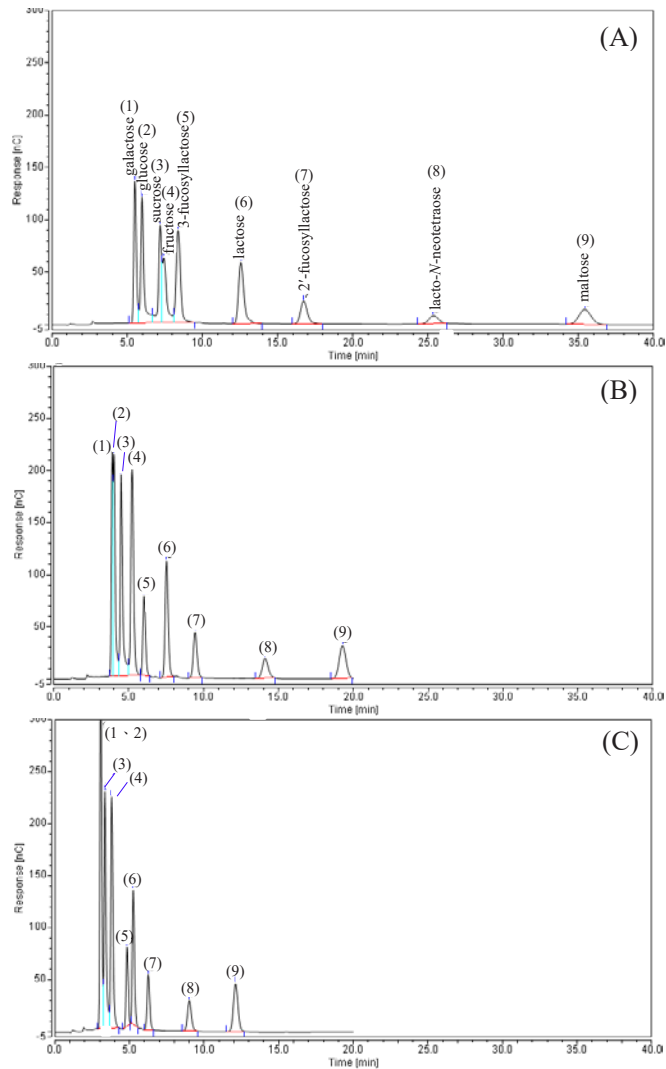
二、前處理條件評估

本研究購置3件市售檢體，因該3件檢體皆為嬰幼兒配方奶粉，主要添加成分亦相似，故後續以S1檢體為代表進行前處理條件之探討。

(一)萃取溶劑

根據文獻探討⁽⁹⁻¹³⁾，檢測食品中HMOs之前處理方式主要是以膜分離(Membrane

Separation)、溶劑萃取或Carrez澄清試劑等方式去除檢體中的蛋白質及脂質等干擾物。其中以溶劑萃取處理流程最為簡便，所需耗費時間及成本皆較低，故於糖類檢測方法中廣為使用。食藥署建議方法前處理係以50%乙醇溶液作為萃取溶劑，使檢體中蛋白質沉澱，以去除干擾。本研究優先參考該方法進行實驗，惟有文獻提出：



圖二、5 mg/mL之2'-岩藻糖基乳糖、乳糖基-N-新四糖與半乳糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、3-岩藻糖基乳糖、乳糖及麥芽糖標準溶液，分別以去離子水及0.2 M氫氧化鈉溶液以90/10 (A)、75/25 (B)及60/40 (C)之比例作為移動相溶液分析之HPIC圖譜

HPIC條件：

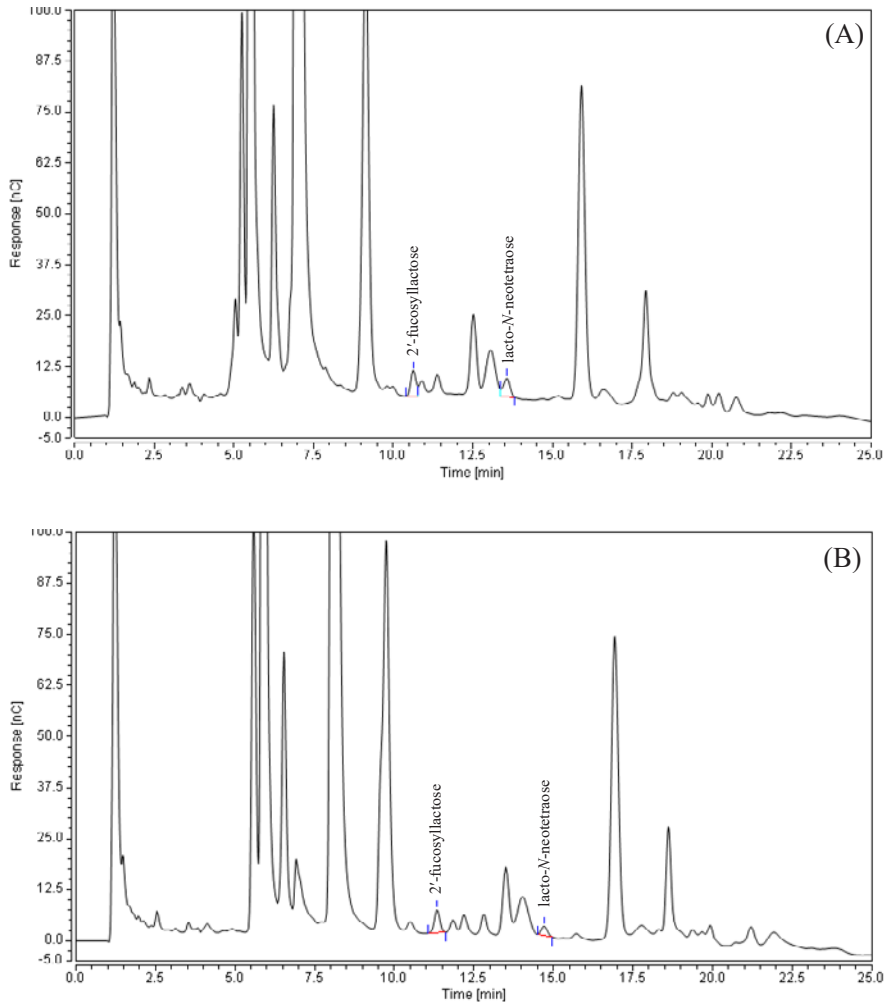
層析管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm × 15 cm；

保護管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm × 3 cm；

層析管溫度：30°C；樣品注入量：10 μL；移動相流速：0.5 mL/min

使用有機溶劑，特別是乙醇或乙腈，在使蛋白質沉澱同時，亦可能導致乳糖與寡糖產生共結晶(Co-crystallization)現象，進

而影響寡糖回收率^(10,12)。故本研究後續分別以30%、50%及70%不同濃度之乙醇溶液，以建議方法2.7.2.節流程操作，檢測



圖三、空白基質添加1 mg/mL之2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖標準溶液分別以管柱溫度30°C (A)及25°C (B)分析之HPIC圖譜

HPIC條件：

層析管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm × 15 cm；

保護管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm × 3 cm；

樣品注入量：10 μL；移動相溶液：去離子水及0.2 M氫氧化鈉溶液以表二之層析條件進行梯度分析；
移動相流速：0.5 mL/min

添加0.05 g/100 g 2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖之奶粉及S1市售檢體，結果如表三，2'-岩藻糖基乳糖在不同濃度乙醇溶液作為萃取溶劑下，其回收率分別為93%、87%及55%，S1市售檢體檢測值為

0.144、0.137及0.106 g/100 g，乳糖基-N-新四糖在不同濃度乙醇溶液作為萃取溶劑下，回收率分別為97%、100%及93%，上述結果顯示70%乙醇溶液作為萃取溶劑會使2'-岩藻糖基乳糖檢測結果顯著降

表三、不同濃度乙醇溶液對2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖之萃取效果

萃取溶劑	待測物	添加回收 ^a		市售檢體 ^b	
		回收率 (%)	相對差異百分比 (%)	平均檢體含量 (g/100 g)	相對差異百分比 (%)
30%乙醇	2'-FL	93	1.59	0.144	1.48
	LNnT	97	3.60	-	-
50%乙醇	2'-FL	87	2.61	0.137	2.61
	LNnT	100	0.15	-	-
70%乙醇	2'-FL	55	16.74	0.106	0.51
	LNnT	93	5.57	-	-

^a 空白檢體中添加0.05 g/100 g 2'-FL及LNnT標準品，n=2

^b 以S1檢體進行測試，n=2

低，30%及50%乙醇溶液則無顯著影響。惟30%乙醇溶液對於蛋白質之沉澱效果較差，萃取液離心後仍呈混濁狀態，較易造成層析管柱壽命縮短等問題，故後續使用50%乙醇溶液進行實驗。

為進一步確認50%乙醇溶液是否會對2'-岩藻糖基乳糖檢測造成影響，本研究參考Christensen等人方法⁽¹³⁾，以膜分離作為前處理步驟，排除有機溶劑可能造成的影響，並依材料與方法第七(二)節檢液調製流程分析S1檢體，並與50%乙醇溶液作為萃取溶液以建議方法2.7.2.節前處理流程檢測結果進行比較，2'-岩藻糖基乳糖檢測值分別為0.136及0.138 g/100 g (表四)，兩者檢測結果差異不大，故合理推測50%乙醇溶液作為萃取溶劑時共結晶現象並不明

顯。綜合考量下，最終以50%乙醇溶液作為萃取溶劑進行後續實驗。

(二)萃取溫度及時間

本研究參考Austin等人⁽¹¹⁾及Christensen等人⁽¹³⁾方法，評估於25°C及70°C萃取環境下分別超音波振盪10、20、30及40分鐘檢測市售產品S1中2'-岩藻糖基乳糖含量，結果顯示萃取溫度及時間對2'-岩藻糖基乳糖之含量並無顯著影響，考量節能環保、檢驗時程及便利性等因素，選擇以常溫25°C超音波振盪10分鐘進行樣品萃取。

綜整上述結果，前處理步驟為以50%乙醇溶液為萃取溶劑，於25°C進行超音波振盪10分鐘，再以振盪器振盪10分鐘，以9,000 × g離心30分鐘，作為前處理流程並以此流程執行後續確效試驗。

三、確效試驗

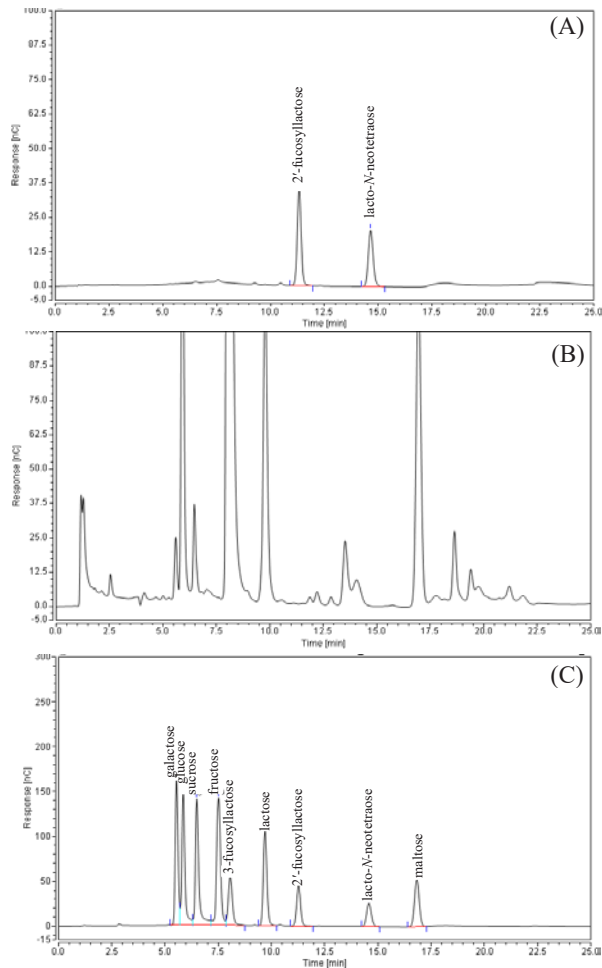
(一)專一性及標準曲線

將空白樣品依本方法流程分析所得之層析圖譜如圖四(B)，與標準品層析圖譜如圖四(A)比對，2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖之滯留時間分別為11.2及14.5分鐘，於空白樣品之層析圖譜中並無明顯干擾波峰出現。上揭兩項待測物與其他糖類

表四、50%乙醇溶液與去離子水對2'-岩藻糖基乳糖之萃取效果

前處理方法	萃取溶劑	2'-岩藻糖基乳糖 ^a	
		平均含量 (g/100 g)	變異係數 (%)
流程一	50%乙醇	0.136	2.81
流程二	去離子水	0.138	1.66

^a 以S1檢體進行測試，n=3



圖四、5 mg/mL之2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖標準溶液(A)、空白基質(B)及5 mg/mL之9種糖類標準溶液(C)之HPIC圖譜

HPIC條件：

層析管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm × 15 cm；

保護管柱：CarboPac PA20，內徑3 mm × 3 cm；

層析管溫度：25°C；樣品注入量：10 μL；

移動相溶液：去離子水及0.2 M氫氧化鈉溶液以表二之層析條件進行梯度分析；

移動相流速：0.5 mL/min

標準品之層析圖譜如圖四(C)比對，顯示並不會受其他糖類干擾。本方法之定量方式採用標準曲線，2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖於標準曲線範圍為1~10 μg/mL時，標準曲線線性回歸相關係數分別

為0.9990及0.9992，評估結果皆符合確效規範。

(二)準確度及精密度

結果如表五，同日間2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖於添加濃度0.04 g/100 g

之變異係數分別為1.7及2.1%，於添加濃度0.08 g/100 g之變異係數分別為3.9及2.6%；異日間於添加濃度0.04 g/100 g之變異係數分別為5.4及4.7%，於添加濃度0.08 g/100 g之變異係數分別為5.2及7.1% (表五)，顯示方法之精密度符合確效規範。

(三) 定量極限之評估

依「定量極限之評估」所得嬰幼兒配方食品之定量極限結果，2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖於定量極限(0.04 g/100 g)之同日間平均回收率為92及103%，變異係數

為1.7及2.1%，S/N比為36及21，皆符合確效規範S/N比 ≥ 10 之要求(表五)，其回收率及變異係數皆符合確效規範。

四、市售產品測試方法適用性評估

本研究以購得之3件原料成分標示含2'-岩藻糖基乳糖之市售產品，進行所建立分析方法之適用性驗證。分析結果如表六，2'-岩藻糖基乳糖含量分別為0.1、0.1及0.2 g/100 g，其檢測值與標示值百分比分別為131、144及96%，皆符合「包裝食品營養標示應遵行事項」檢測值

表五、2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖添加於嬰幼兒配方食品空白基質^a之方法確效結果

分析物	添加濃度 (g/100 g)	同日間(n=5)		異日間(n=10)		訊噪比
		平均回收率 (%)	變異係數 (%)	平均回收率 (%)	變異係數 (%)	
2'-FL	0.04	92	1.7	88	5.4	36
	0.08	99	3.9	96	5.2	
LNnT	0.04	103	2.1	99	4.7	21
	0.08	105	2.6	99	7.1	

^a 嬰幼兒配方食品空白基質成分：

麥芽糊精、部分水解乳清蛋白、高油酸葵花子油、蔗糖、大豆油、椰子油、半乳寡糖(Galactooligosaccharides, GOS)、磷酸二氫鉀、磷酸鈣、檸檬酸鈣、氯化鉀、氯化鈉、高山被孢黴發酵產物、氯化鎂、氫氧化鉀、維生素C、寇氏隱甲藻油、L-苯丙胺酸、檸檬酸鈉、氫氧化鈣、高油酸紅花子油、L-組胺酸、牛磺酸、肌醇、硫酸亞鐵、5'-胞核苷單磷酸鹽、葵花子油、5'-尿核苷單磷酸鹽、檸檬酸鉀、乙酸d- α -生育醇酯(維生素E)、混合濃縮生育醇(抗氧化劑)、菸鹼醯胺、本多酸鈣、硫酸銅、維生素B₂、維生素A棕櫚酸酯、維生素B₁、維生素B₆、硫酸錳、葉黃素、葉酸、 β -胡蘿蔔素、碘化鉀、維生素K₁、生物素、亞硒酸鈉、維生素D3、維生素B₁₂

表六、市售嬰幼兒配方產品中2'-岩藻糖基乳糖含量之方法驗證結果

編號	型態	檢測值(n=2)		標示值 (g/100 g)	檢測值/標示值 (%)	法規使用限量 (g/L) ^b	使用限量符合性 ^b
		g/100 g	g/L ^a				
S1	奶粉	0.13	0.20	0.1	131	1.2	符合
S2		0.14	0.22	0.1	144		符合
S3		0.19	0.26	0.2	96		符合

^a 依產品包裝標籤指示之調配方式進行單位換算：

檢體編號S1：取30.8 g產品加水沖調成200 mL奶水

檢體編號S2：取152 g產品加水沖調成1 L奶水

檢體編號S3：取13.7 g產品加水沖調成100 mL奶水

^b 依「食品原料整合查詢平臺」，2'-岩藻糖基乳糖使用限量為1.2公克/公升，以即食或依標籤指示調配後供食之狀態作為計算基準

需大於標示值80%之規定⁽¹⁴⁾，其含量經換算亦皆未超過2'-岩藻糖基乳糖用於嬰兒配方食品、較大嬰兒配方輔助食品及專供七歲以下兒童之乳粉或類似產品之使用限量為1.2公克/公升之規定，且皆未檢出乳糖基-N-新四糖。

結 論

本研究配合行政管理之需求，建立2'-岩藻糖基乳糖及乳糖基-N-新四糖之檢驗方法，確效結果皆符合食藥署「食品化學檢驗方法之確效規範」，並已於111年7月27日公開「食品中2'-岩藻糖基乳糖之檢驗方法(TFDAA0095.00)」⁽¹⁵⁾，可作為市售相關產品之標示符合性及使用限量之監測使用。

參考文獻

1. Cheng, Y.J. and Yeung, C.Y. 2021. Recent advance in infant nutrition: Human milk oligosaccharides. *Pediatr. Neonatol.* 62: 347-353.
2. Auer, F., Jarvas, G. and Guttman, A. 2021. Recent advances in the analysis of human milk oligosaccharides by liquid phase separation methods. *J. Chromatogr. B* 1162: 122497.
3. Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Altaye, M., Jiang, X. and *et al.* 2004. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J. Pediatr.* 145: 297-303.
4. Reverri, J.E., Devitt, A.A., Kajzer, J.A., Baggs, G.E. and *et al.* 2018. Review of the clinical experiences of feeding infants formula containing the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose. *Nutrients* 10(10): 1346.
5. Musumeci, M., Sempore, J., D' Agata, A., Sotgiu, S. and *et al.* 2006. Oligosaccharides in colostrum of Italian and Burkina women. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 43: 372-378.
6. 衛生福利部。2023。以基因改造大腸桿菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3) #1540菌株發酵生產之食品原料2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose)之使用限制及標示規定。112.02.07衛授食字第1111303588號公告修正。
[<http://consumer.fda.gov.tw/Law/Detail.aspx?nodeID=518&lawid=782>]
7. 衛生福利部。2023。以基因改造大腸桿菌(*Escherichia coli*) K-12 DH1 MDO MAP1001d菌株發酵生產之食品原料2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose)之使用限制及標示規定。112.02.07衛授食字第1111303588號公告修正。
[<http://consumer.fda.gov.tw/Law/Detail.aspx?nodeID=518&lawid=801>]
8. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=4115>]。
9. 衛生福利部食品藥物管理署。2022。食品中糖類之檢驗方法(TFDAA0022.02)。[<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f638028130503557335&type=2&cid=41871>]
10. Liu, Z., Moate, P., Cocks, B. and Rochfort, S. 2014. Simple liquid chromatography-mass spectrometry method for quantification of major free oligosaccharides in bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* 62(47): 11568-11574.
11. Austin, S., Cuany, D., Michaud, J., Diehl, B. and *et al.* 2018. Determination of 2-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose in infant formula. *Molecules* 23: 2650.
12. Tonon, K.M., Miranda, A., Abrão, A.C.F.V., de Moraes, M.B. and *et al.* 2019. Validation and application of a method for the simultaneous absolute quantification of 16 neutral and acidic

- human milk oligosaccharides by graphitized carbon liquid chromatography – electrospray ionization – mass spectrometry. *Food Chem.* 274: 691-697.
13. Christensen, A.S., Skov, S.H., Lendal, S.E. and Hornshøj, B.H. 2020. Quantifying the human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose in different food applications by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Food Sci.* 85(2): 332-339.
 14. 衛生福利部。2018。包裝食品營養標示應遵行事項。107.03.31衛授公字第1071300530號公告修訂。[<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?cid=3&id=26968>]。
 15. 衛生福利部食品藥物管理署。2022。食品中2'-岩藻糖基乳糖之檢驗方法(TFDAA0095.00)。[<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f637943561497164005&type=2&cid=41308>]。

Development of an Analytical Method for 2'-Fucosyllactose and Lactose-N-neotetraose in Infant Formula

CHING-YU HSU, PAI-WEN WU, SHU-HAN CHANG, YA-MIN KAO,
SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

Human milk oligosaccharides (HMOs) are the third most abundant component in human breast milk after lactose and lipids, of which 2'-fucosyllactose (2'-FL) and lactose-*N*-neotetraose (LNnT) are the most commonly used additives in commercial products. 2'-FL originated from the fermentation of specific strains is allowed to be used in infant and follow-up formula, and milk powder or similar products for children under 7 years old, which is regulated by the Ministry of Health and Welfare in Taiwan announced in 2023. The maximum limit is 1.2 g/L. In this study, an analytical method for the analysis of 2'-FL and LNnT in infant formula was established by using high performance ion chromatograph (HPIC) coupled with a pulsed electrochemical detector (PED). The sample was extracted with 50% ethanol and then centrifuged. The supernatant was analyzed by a CarboPac PA20 (3 mm × 15 cm) column at 25°C with a flow rate of 0.5 mL/min through gradient elution. The mobile phase was consisted with deionized water and sodium hydroxide solution, and the analysis could be finished in 35 min. The method was validated by spiking 2'-FL and LNnT at the levels of 0.04 g/100 g and 0.08 g/100 g into the blank infant formula powder, respectively. The average recoveries of 2'-FL and LNnT for intra-day analyses were in the range of 92-105% with coefficients of variation between 1.7 and 3.9%. The average recoveries of 2'-FL and LNnT for inter-day analyses were in the range of 88-99%, with coefficients of variations between 4.7 and 7.1%, respectively. All results showed that the method offered good precision and accuracy. A surveillance study consisted with 3 commercial infant formula products showed the detected contents of 2'-FL were ranged from 0.20 g/L to 0.26 g/L, which did not exceed the maximum limit of 2'-FL. Besides, the labeling values of the 3 samples were all in compliance with the Regulations of Nutrition Labeling for Prepackaged Food Products.

Key words: 2'-fucosyllactose, lactose-*N*-neotetraose, human milk, high performance ion chromatograph